云 南 植 物 研 究 1991；13 (3)：315—320
Acta Botanica Yunnanica

滇紫草愈伤组织培养与紫草素产生

周立刚　郑光植　王世林

(中国科学院昆明植物研究所，昆明 650204)

摘要　浓度为 10^{-5}mol／l 和 10^{-6}mol／l 的 2,4–D 和 NAA 分别与 10^{-5}mol／l 的 KT 组合，能明显抑制滇紫草（*Onosma paniculatum* Bur. et Fr.）愈伤组织中紫草素的产生，但几乎不受天然生长素 IAA 和 KT 组合的影响。葡萄糖较蔗糖能更有效地促进紫草素的产生，它们的最适浓度均为 6%。LH 和 CH 能抑制紫草素的产生，CH 浓度大于 0.02%时能抑制愈伤组织的生长，LH 对生长无明显影响。椰乳浓度为 10%时，能明显地促进紫草素的产生，紫草素的含量是对照的 24 倍。

关键词　滇紫草；愈伤组织；紫草素

CALLUS CULTURE OF ONOSMA PANICULATUM AND SHIKONIN PRODUCTION

ZHOU Li–Gang, ZHENG Guang–Zhi, WANG Shi–Lin

(*Kunming Institute of Botany, Academia Sinica*, Kunming 650204)

Abstract　Shikonin production of *Onosma paniculatum* Bur. et Fr. callus was inhibited by combination of 2,4–D and NAA of 10^{-5}mol／l and 10^{-6}mol／l with 10^{-5}mol／l KT separately, and was not affected by combination of IAA with KT in concentration given. Glucose was more effective on shikonin production in callus than sucrose. An appropriate concentration of glucose and sucrose on shikonin production was 6% separately. Lactalbumin hydrolysate (LH) and casein hydrolysate (CH) inhibited production of shikonin in callus. When concentration of CH was bigger than 0.02%, the growth of callus was inhibited. LH had no obvious effects on callus growth. Coconut milk which concentration was 10% stimulated production of shikonin which content was 24 times of the control.

Key words　*Onosma paniculatum;* Callus; Shikonin

滇紫草(*Onosma paniculatum* Bur. et Fr.) 主产云南，其主要有效成分为紫草素(shikonin)。要实现滇紫草次级代谢物紫草素的工业化生产，关键在于提高培养组织和细胞的生长速率和紫草素含量。通过采用不同的措施：如改变培养基成分，筛选高产细胞系和加入诱导子等均可能有效地提高紫草素的含量。我们曾用诱导子寡糖素培养滇紫

1990年7月收稿，1990年10月定稿。

草愈伤组织，能明显地促进紫草素的合成[1]。朱蔚华等曾进行了滇紫草愈伤组织优良无性系的筛选[2]。本文报道改变培养基成分来提高滇紫草愈伤组织的生长速率和紫草素含量的结果。

材料和方法

1.愈伤组织培养　用于本研究的愈伤组织是1988年诱导，并经10–13次继代培养的茎愈伤组织无性系[1,3]。继代培养30天转代1次。以LS培养基[4]为基本培养基，培养方法同前[1,3]。

2.愈伤组织生长和紫草素含量的测定　50ml容积的三角瓶内装培养基20ml。愈伤组织收获后冰冻干燥至恒重。以愈伤组织产量代表其生长，愈伤组织产量以每瓶的毫克数表示。将冰冻干燥的愈伤组织打成细粉，含量测定同于Mizukami[5]，紫草素含量以每克愈伤组织中所含紫草素的毫克数表示。将紫草素含量乘以愈伤组织干重即得紫草素产量。本文所得结果均为4次重复平均值。

3.几种特殊试剂的加入　所加入的各种激素均采用过滤灭菌。水解乳蛋白、水解酪蛋白、椰乳和活性碳在配培养基时一同加入。所用花粉为党参花粉经超声波破碎后在配培养基时一同加入。

结果与讨论

1.不同激素组合对愈伤组织培养的影响

激素的影响是植物组织和细胞培养中次级代谢物产生的主要因素之一。作者用KT分别与2,4–D、NAA和IAA进行浓度（2个梯度）组合实验，结果如表1所示。浓度为10^{-5}mol／l和10^{-6}mol／l的2,4–D和NAA分别与10^{-5}mol／l的KT组合，均能明显地抑制愈伤组织中紫草素的产生，其中2,4–D与KT组合抑制紫草素产生的程度更为明显。而愈伤组织生长以及紫草素的产生几乎不受天然生长素IAA和KT组合的影响。Inouye等[5]曾用同位素示踪法证明了2,4–D能阻断牻牛儿基氢醌(geranylquinol)的代谢，而牻牛儿基氢醌正是紫草素生物合成过程中的1个中间代

表1　不同激素组合对滇紫草愈伤组织培养的影响

Table 1.　Effects of different combinations of hormones on callus culture of *O. paniculatum*

激素组合 Combination ofhormones	愈伤组织产量 Callus yield (mg／flask)	紫草素含量 Shikonin content (mg／g DW)	紫草素产量 Shikonin yield (mg／flask)
10^{-5}mol／l KT+10^{-5}mol／l 2,4–D	185.3	0.388	0.071
10^{-5}mol／l KT+10^{-6}mol／l 2,4–D	158.8	0.143	0.023
10^{-5}mol／l KT+10^{-5}mol／l NAA	233.4	0.830	0.194
10^{-5}mol／l KT+10^{-6}mol／l NAA	236.5	0.804	0.190
10^{-5}mol／l KT+10^{-5}mol／l IAA	216.7	1.441	0.312
10^{-5}mol／l KT+10^{-6}mol／l IAA	250.1	1.474	0.369

接种量：110.0毫克干重／瓶。Inoculum quantity：110.0mg DW／flask。

谢产物，至于 NAA 抑制紫草素合成的机理还有待于进一步研究。我们在以后的滇紫草愈伤组织培养研究中均采用 KT 和 IAA 的适当浓度组合即 KT10^{-5}mol／l 和 IAA 10^{-6}mol／l。

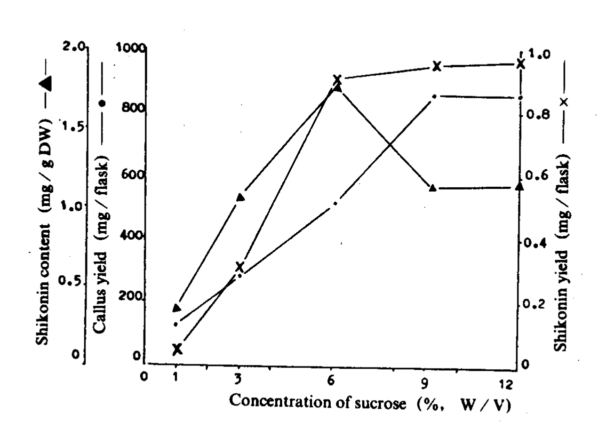


图 1　蔗糖对滇紫草愈伤组织培养的影响
接种量:108.9 毫克干重／瓶
Fig. 1 Effects of sucrose on callus culture of *O.paniculatum*. Inoculum quantity: 108.9 mg DW / flask

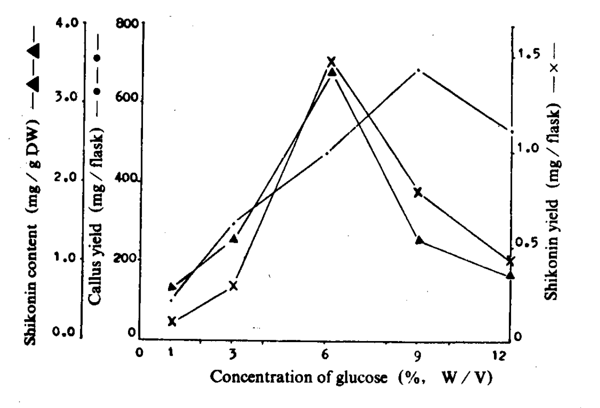


图 2　葡萄糖对滇紫草愈伤组织培养的影响
接种量:108.9 毫克干重／瓶
Fig. 1 Effects of glucose on callus culture of *O.paniculatum*. Inoculum quantity: 108.9 mg DW / flask

2.蔗糖和葡萄糖对愈伤组织培养的影响

Ikeda 等[7]报道烟草悬浮培养物中所加入蔗糖浓度为 1%时泛醌含量最高，而 Zenk 等[8]报道培养海巴戟（*Morinda citrijolia*）细胞以产生蒽醌类化合物的适宜蔗糖浓度高达 7%。为了确定适合于滇紫草愈伤组织生长和紫草素产生的适宜蔗糖浓度，我们采用了 1–12%的蔗糖添加在 LS 培养基中。结果如图 1 所示。当蔗糖浓度为 6%时紫草素的含量达最高值并趋于稳定。蔗糖浓度为 9%时愈伤组织产量达最高值，紫草素含量迅速降低。故滇紫草愈伤组织培养产生紫草素的合适蔗糖浓度为 6%。葡萄糖作为碳源对愈伤组织培养的影响结果见图 2。当葡萄糖浓度为 6%时紫草素的含量和产量均达最高值。浓度大于 6%时，愈伤组织产量和紫草素含量均明显降低。综合图 1 和图 2，当葡萄糖和蔗糖浓度在 9%以下时愈伤组织生长和糖浓度呈现正相关。当葡萄糖和蔗糖浓度分别为 6%时，葡萄糖较蔗糖能更有效促进紫草素的产生。Mizukami 等[4]曾用葡萄糖、蔗糖和果糖作为 LS 培养基的碳源来培养紫草（*Lithospermum erythrorhizon*）愈伤组织，发现蔗糖效果最好，且最适浓度为 5%，这与我们的研究结果不同。以上结果还说明滇紫草和紫草两类愈伤组织培养及其紫草素的产生在碳源需要上存在一定差异。

3.水解酪蛋白和水解乳蛋白对愈伤组织培养的影响

水解酪蛋白（CH）和水解乳蛋白（LH）作为有机氮添加入培养基中以培养滇紫草愈伤组织，结果见图 3 和图 4。CH 的浓度为 0.02%时能轻微地促进愈伤组织的生长，浓度大于 0.02%时则抑制了愈伤组织的生长；LH 对愈伤组织生长无影响。CH 和

LH在所试浓度范围内，均抑制紫草素的产生且抑制作用随CH和LH浓度的增加而逐渐增强。以上结果看出，较高的有机氮源能明显地抑制滇紫草愈伤组织中紫草素的合成，这提示氮源可能是紫草素产生的主要调节因子。

4.不同添加剂对愈伤组织培养的影响

采用椰乳、活性碳和破碎党参花粉3种添加剂加入到培养基中，对滇紫草愈伤组织培养的影响，结果如表2所示。所用培养基均为附加10^{-5}mol／l KT，10^{-6}mol／l IAA和6%蔗糖的LS培养基。所加入的3种添加剂均能明显地提高愈伤组织中紫草素的含量，以椰乳最为明显，紫草素含量是对照的24倍。但椰乳能抑制愈伤组织的生长，其它两种添加剂对愈伤组织生长无明显影响。椰乳能有效地促进紫草素的合成，这提示在今后的两步法培养中，在生产培养基中加入椰乳来提高紫草素的含量和产量也许不失为一种很有前途的有机添加剂。

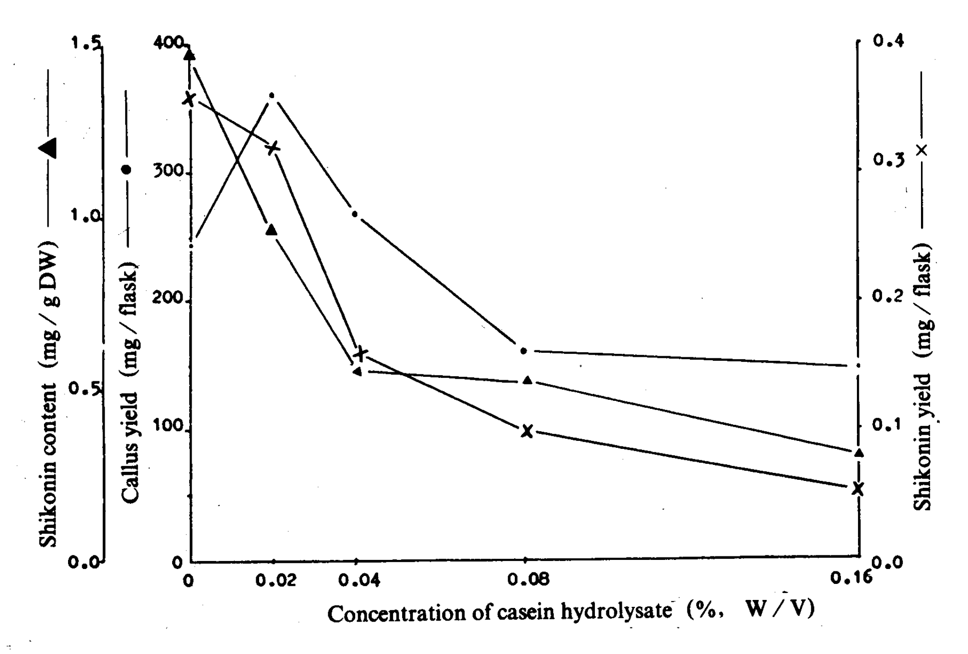


图3 水解酪蛋白（CH）对滇紫草愈伤组织培养的影响
接种量：109.3毫克干重／瓶
Fig. 3 Effects of casein hydrolysate on callus culture of *O. panicuatum*
Inoculum quantity: 109.3 mg DW / flask

以上结果说明滇紫草愈伤组织具有较好的合成紫草素的能力，且紫草素的含量是可以调节的。这为进一步深入研究和将来的工业化生产奠定了良好的基础。

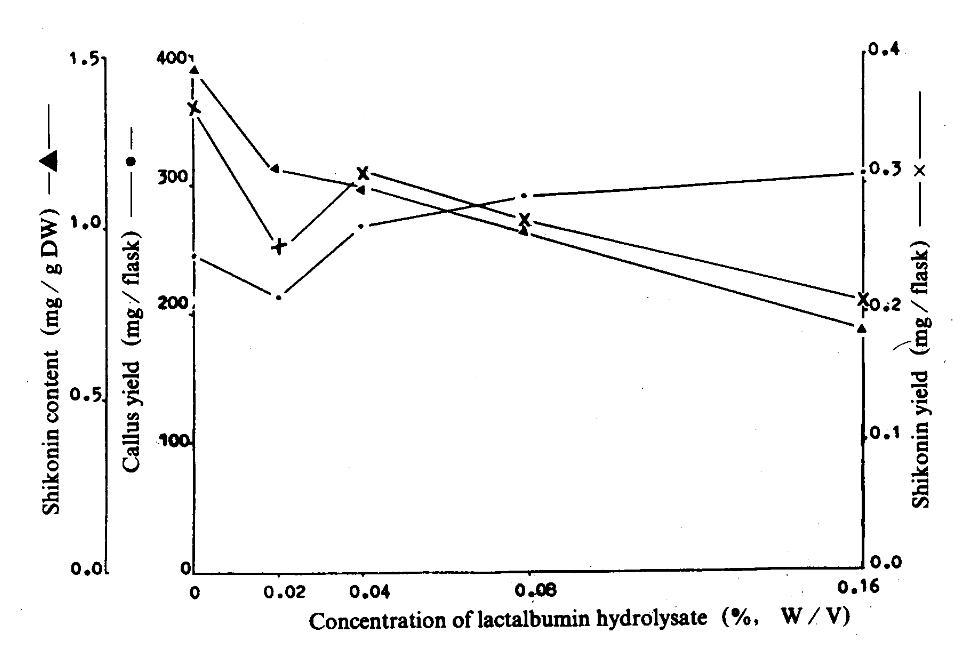


图 4 水解乳蛋白 (LH) 对滇紫草愈伤组织培养的影响
接种量：109.3 毫克干重 / 瓶
Fig. 4 Effects of lactalbumin hydrolysate on callus culture of *O. panicuatum*
Inoculum quantity: 109.3 mg DW / flask

表 2 不同添加剂对滇紫草愈伤组织培养的影响
Table 2. Effects of different additives on callus culture of *O. paniculatum*

添加剂 Additives	愈伤组织产量 Callus yield (mg / flask)	紫草素含量 Shikonin content (mg / g DW)	紫草素产量 Shikonin yield (mg / flask)
对照 control(0.0%)	225.0	1.39	0.313
椰乳 Coconut milk(10%)	147.5	33.6	4.956
活性碳 Active carbon (0.2%)	222.5	4.97	1.006
破碎花粉 Broken pollen(0.2%)	233.6	7.51	1.754

接种量：109.0 毫克干重 / 瓶。Inoculum quantity: 109.0mg DW / flask.

致谢 本所生理室仪器组周立强和易永生给予支持和帮助。

参考文献

1 周立刚，郑光植，王世林. 寡糖素对滇紫草愈伤组织色素合成的影响. 天然产物研究与开发 1990; **2:** 22
2 朱蔚华，樊红霞，胡秋等. 滇紫草愈伤组织的诱导培养及优良无性系的筛选。中药材 1990; **13:** 6—9
3 周立刚，郑光植，徐纯. 滇紫草愈伤组织培养的初步研究. 云南植物研究 1991; **13** (2): 237-240
4 Linsmaier E F, Skoog F. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol plant* 1965; **18:** 100—127
5 Mizukami H, Konoshima M, Tabata M. Effect of nutritional factors on shikonin derivative formation in *Lithospermum* callus cultures. *Phytochemistry* 1977; **18:** 1183—1186

6 Inouye H, Ueda S, Inoue K et al. Biosynthesis of shikonin in callus culture of *Lithospermum erythrorhizon*. *Phytochemistry* 1979; **18:** 1301—1308

7 Ikeda T, Matsumoto T, Noguchi M. Studies on the culture conditions of higher plant cells in suspension culture. part VIII. effects of nutritional factors on the formation of ubiquinone by tobacco plant cells in suspension culture. *Agr Biol Chem* 1976; **40:** 1765—1770

8 Zenk M H, El-Shangi H, Schulte U. Anthraquinnone production by cell suspension cultures of *Morinda citrifolia*. *Planta Medica* 1975; **Suppl:** 79—101

* * * * *

(上接 314 页)

Hz，H-3α。所用仪器频率及溶剂若在实验部分的总论中已注明，则以下皆可省略。

11. 质谱须注明所用的方法（EIMS，CIMS，GC-MS，FABMS 等）及离解能，只须给出分子离子峰及重要的特征碎片峰（相对强度），如：EIMS（70eV）m／z（%）：386$[M]^+$（36），368$[M-H_2O]^+$（100），275$[M-111]^+$（35）等。高分辨质谱(HRMS)若有必要可多给一些信息。

12. 紫外光谱表示法，如：UVλ_{max}^{EtOH} nm(lgε)：203（4.17）。

13. 红外光谱表示法，如：IR$\nu_{max}^{CHCl_3}$ cm^{-1}：1740。官能团的指定放在圆括号内，如：1740（>C=0）。若要标明吸收带的强度，则采用以下缩写符号：w（弱），m（中等），v（可变），s（强），vs（很强）。

14. 有机化合物和无机化合物及有关的缩写符号须规范化(参考 CA)，如氘代溶剂 $CDCl_3$，DMSO-d_5，D_2O，pyridine-d_5 等。常见化学试剂在文中均以化学符号表示，如：MeOH，EtOH，n-BuOH，PrOH，iso-PrOH，PhOH（苯酚），petrol（石油醚），$CHCl_3$，CCl_4，C_6H_6，Et_2O，Me_2CO，HOAc，EtOAc，THF，Ac_2O，NaOMe，CH_2N_2，HCO_2H（甲酸），TCA（三氯乙酸），TFA（三氟乙酸），NaOAc，NaOH，HCl，H_2SO_4，CO_2，H_3BO_3，NH_3，N_2 等。

15. 制备薄层析须注明（1）薄层厚度；（2）样品的量；（3）确定带的方法；（4）从吸附剂上洗脱下化合物所用的溶剂。特殊 TLC 的吸附剂须注明，如：$AgNO_3$- 硅胶（1：9）。

16. 气相色谱（GC）须注明检测器（FID，EC 等），载气及流速，操作温度，柱子情况等。

17. 高压液相（HPLC）须注明（1）柱子情况，如大小、型号；（2）压力及溶剂；（3）检测方法，如 UV 或折射率。

18. X-衍射只需给出立体结构图（最好有键长）及必要的数据，详细记录可指明在什么地方储存。